

■受領No.1409

選択的スプライシングバリエント制御による 治療抵抗性乳がん治療法の確立



代表研究者

眞田 文博

大阪大学大学院医学系研究科 臨床遺伝子治療学講座 寄附講座准教授

1. 研究目的

乳がんは女性で最も頻度の高い癌である。日本では年間およそ8.5万人が新規に罹患し、1.5万人が死亡している。治療標的としてエストロゲン受容体・プロゲステロン受容体・HER2の各受容体があるものの、これらの標的を持たないトリプルネガティブ乳がん(TNBC)は既存化学療法に対して抵抗性を示し、再発時の予後はきわめて不良である。我々は抗癌剤治療抵抗性マーカーと関連する因子を網羅的に探索し細胞外マトリックス蛋白であるペリオスチンを見出した。ペリオスチンはそのC末端に選択的スプライシングバリエントを有しており、生理的なバリエントと抗がん剤投与後に発現亢進するバリエントが存在する。我々はこれまでに、抗がん剤投与後に発現亢進するバリエントに対する特異的中和抗体を作成し、複数のTNBC株において既存抗がん剤との併用効果を確認し、TNBCの化学療法抵抗性改善薬としての臨床研究を準備している。この抗体に対する患者個人の反応性を治療前に検査するために、目的のペリオスチンバリエントが確実に分泌されていることを証明するコンパニオン診断薬が重要となる。この研究ではスプライシングバリエント特異的ELISAシステムとIn situ hybridization法の樹立を目指し、化学療法抵抗性乳がんの新規治療法を確立したいと考えている。

2. 研究内容

2.1 スプライシングバリエント特異的ELISAシステムの樹立

ペリオスチンはそのC末端に4つのメジャーなスプライシングバリエントを有しており、生理的にはエクソン17, 21のない一番短いアイソフォームがmRNAレベルで1000-10000万倍程度他のバリエントよりも発現が高い(図1)。例えば乳がん、

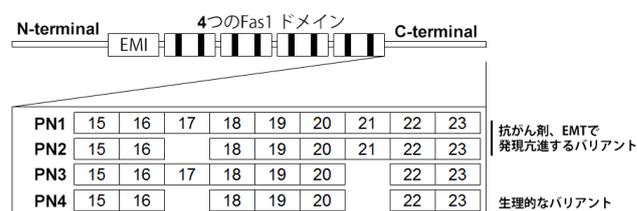


図1. ペリオスチン選択的スプライシングバリエント(exon15~23を表示)

特にトリプルネガティブ乳がんでは、バリエントの発現変化が起き、エクソン21を含有するペリオスチンバリエント(病的ペリオスチン)が増加する(図2)。このようにペリオスチンエクソン21抗体は選択性の高い、安全な治療法につながると考えられる。私たちはコンパニオン診断薬開発を目的に、エクソン21を含有する病的ペリオスチンを測定するために、エクソン14, 21, 23に対するモノクローナル抗体を作成して、ELISAシステムの構築を行っている。各モノクローナル抗体は約200種類の候補抗体から1次スクリーニングを行い、さらに抗原との結合力から2次スクリーニングを行い、1種

類を選択した。選択には図2の免疫沈降データで示すように患者腫瘍組織に発現するペリオスチンを認識できるかどうかも含めて検討を行い、選択している。また各組み合わせでcapture抗体にはダイレクト標識を行い、バックグラウンドの低減を試みた。測定には人工ペリオスチン蛋白および病的ペリオスチン低分泌細胞株(SUM159PT)、高分泌TNBC細胞株(Hs578t)培養上清を用いた。図3に示すように、TNBC分泌エクソン21含有ペリオスチンは作成ELISAシステムにより良好に測定され、またHS578t>SUM159PTでの分泌量パターン、希釈直線性(非特異的結合の確認)も保たれていた。現在、臨床サンプルを用いた検討を繰り返しており、TNBC患者での病的ペリオスチン発現量および抗癌剤での誘導について検討中である。将来的に治験時に診断薬として用い、患者選択のためのコンパニオン診断薬として開発を進める予定である。

2.2 In situ hybridization 法の樹立

本研究ではまず、全長ペリオスチンに対するプローブを用いて、各種条件検討を行った。組織切片のmRNA保存状態を検討するため、陽性プローブおよび陰性プローブをデザインし、陽性プローブでスコア3点以上、陰性プローブでスコア1点未満(ドット数でスコア化)を適応サンプルと判断した。また試験の妥当性はHela細胞を用いて行った。加熱処理ステップの条件を3条件検討し、本プローブの条件として95Cの加熱処理ステップが最も良好であった。検討したヒト乳がん24検体のうち、8検体で不適応サンプルと判定された。適応サンプルのうち、右図に示すようにペリオスチンシグナルはドット状に観察され、そのほとんどが非がん細胞に局在していた(図:乳がん、invasive carcinoma, Grade 2, Stage IIA)。現在、以上の条件を用いて、エクソン17および21に対する短いプローブを作成し、Basescopeによるバリエーション特異的発現の解析を行っている。

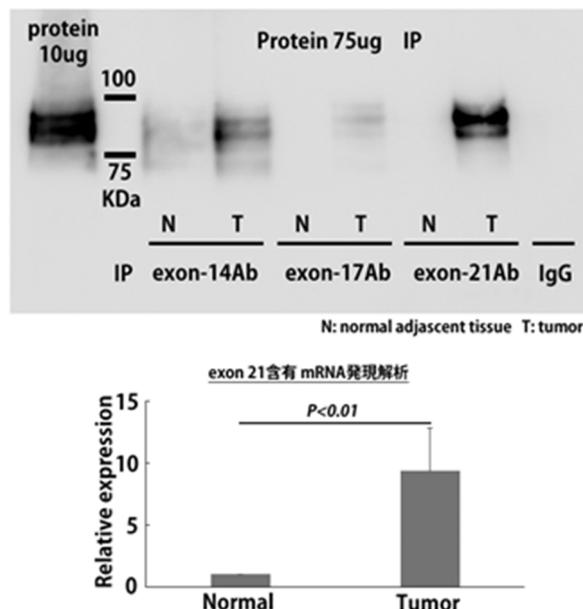


図2. TNBC腫瘍と周囲正常組織ペリオスチンバリエーション発現解析

実験1		実験2	
人工ペリオスチン蛋白	吸光度	SUM159PT (ペリオスチン低発現)	Hs578t (ペリオスチン高発現)
STD(ng/mL)	OD450	OD450	OD450
120	3.039	0.556	2.336
60	1.831	0.374	1.606
30	1.090	0.303	0.804
15	0.726	0.302	0.478
7.5	0.501	0.255	0.426
3.75	0.411	0.211	0.292
1.88	0.279	0.222	0.264
Back	0.222		

8.67ng/mL 84.74ng/mL

図3. 人工ペリオスチンとペリオスチン変異体濃度測定

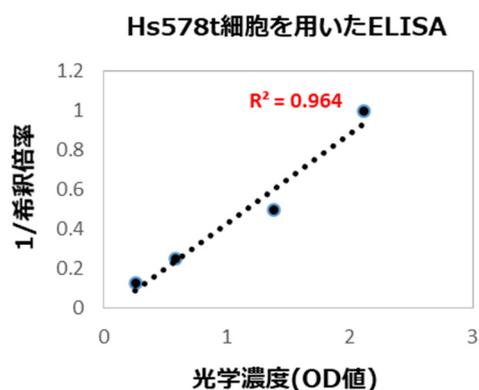
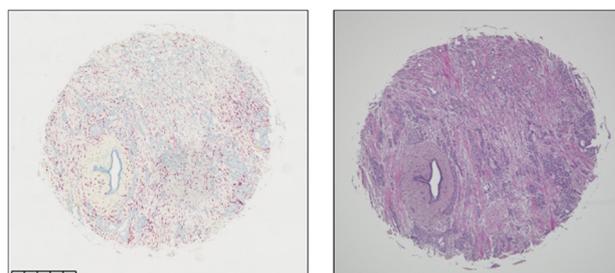


図4. 希釈直線性の確認



3. 発表 (研究成果の発表)

藤川龍弥、眞田文博、谷山義明、柴田佳那、葛城
鳴門、鯉淵信孝、中川涼子、楽木宏実、森下竜一

Development of target therapy against
chemoresistant triple-negative breast cancer

抗癌剤治療抵抗性トリプルネガティブ乳がんに対
する治療法の確立

第43回日本分子生物学会

会 期：2021年12月1日 (水) ~3日 (金) (3日間)

会 場：パシフィコ横浜